

## IMOBILISASI ANTIBODI T<sub>3</sub> PADA TABUNG SECARA KOVALEN

Misyetti, Entit Susilawati  
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

### ABSTRAK

IMOBILISASI ANTIBODI T<sub>3</sub> PADA TABUNG SECARA KOVALEN. Metode RIA dengan teknik pemisahan fase padat bertujuan untuk membuat proses *assay* lebih praktis dan menghindari penggunaan sentrifuga. Tabung bersalut antibodi adalah satu diantara beberapa metode fase padat. Pada percobaan ini teknik yang akan dilakukan adalah tabung bersalut antibodi dengan teknik penyalutan secara kimia. Untuk penyalutan tabung secara kimia ini dibutuhkan senyawa kimia yang mudah terikat pada tabung dan mempunyai gugus aktif untuk membentuk ikatan kovalen dengan antibodi. Pada percobaan ini digunakan glutaraldehid untuk mengaktifasi tabung dan dicari suatu kondisi yang optimal untuk mengaktifasi dan untuk mengikatkan antibodi pada tabung. Dari hasil percobaan didapatkan bahwa untuk mengaktifasi tabung dengan glutaraldehid dibutuhkan konsentrasi 0,1 % dengan waktu reaksi 3 jam pada pH 8. Dibandingkan dengan metode antibodi rangkap memberikan hasil yang sama.

### ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF T<sub>3</sub> ANTIBODY IN INSIDE TUBE SURFACE BY KOVALEN METHOD. RIA method by using solid phase technique was purposed the more practice of assay and to avoid using centrifuge. Coated tube antibody is one of many kind the solid phase method. The experiment use antibody coated tube by chemistry. Compound with active side or groups is needed by the method to make covalent linkage with antibody. The aim of the experiment is to find the optimal condition of activation of tube with glutaraldehid and to bind the antibody. The result show that the glutaraldehid needed 0,1 % of concentration and 3 hours of time and 8 of PH. Comparison with double antibodies technique found the same result.

### PENDAHULUAN

Antibodi yang diikatkan pada fase padat banyak digunakan untuk pemurnian senyawa biologis yaitu dengan metode imunokromatografi. Dalam *radioimmunoassay*, antibodi fase padat digunakan untuk memisahkan antigen bebas dan terikat dengan antibodi.

Menggunakan metode antibodi fase padat ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi pemisahan antigen bebas dan yang terikat antibodi serta untuk mempermudah teknik pemisahan. Metode pemisahan antibodi fase padat ini pertama kali dikemukakan oleh Wide dan Porath (1966), Cat dan Tregear (1967), Updike (1973) Donini (1969), Nye (1976) serta Halpern dan Borden (1979)(1). Beberapa materi penyangga dapat digunakan untuk pengikat antibodi seperti selulosa, polietilen atau polipropilen dalam bentuk butiran atau tabung, partikel magnetik-selulosa atau sephadex (1,2). Pengikatan antibodi ini dapat secara fisika dan dapat pula secara kimia.

Penelitian ini adalah mempelajari teknik penempelan antibodi pada tabung secara kimia. Prinsip pengikatan antibodi pada tabung secara

kimia adalah mengaktifasi tabung dengan senyawa tertentu yang mempunyai gugus aktif seperti cianobromida, glutaraldehid (3). Selanjutnya antibodi akan bereaksi dengan gugus aktif dari senyawa tersebut secara kovalen.

Dalam percobaan ini digunakan senyawa glutaraldehid untuk mengaktifkan tabung. Glutaraldehid mempunyai gugus fungsi aldehid yang akan membentuk ikatan kovalen dengan antibodi. Mula-mula glutaraldehid dalam suasana basa membentuk polimer sesamanya dan menempel pada tabung, kemudian dengan penambahan antibodi, ia akan berikatan secara kovalen.

Sesuai dengan tujuan penempelan antibodi pada fase padat adalah untuk RIA T<sub>3</sub>, maka beberapa tahap eksperimen adalah sebagai berikut: aktivasi tabung dengan glutaraldehid, immobilisasi anti T<sub>3</sub> pada tabung tersebut, dan *assay* RIA. Masing-masing percobaan ditentukan kondisi optimum yang meliputi penentuan konsentrasi, keasaman, volume dan waktu inkubasi. Kondisi yang menghasilkan ikatan maksimum yang tertinggi, ikatan tidak spesifik

yang terendah dan kesensitifan yang tertinggi dianggap kondisi yang terbaik.

## BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: glutaraldehid (Fluka), antibodi T<sub>3</sub> (produksi sendiri dengan menggunakan kelinci untuk penumbuhannya), trietanol amin (E Merck), protein A sepharosa (pharmacia), glisin (E.Merck), dapar tris (E.Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan lain lain. Peralatan yang digunakan adalah tabung polietilen, ependorf, pencah  $\gamma$  miniassay type 20

## TATA KERJA

### Pemurnian antibodi

Nol koma tiga g protein A sepharose direndam dalam dapar fosfat 0,1 M pH 7,4 kira-kira 15 menit, dimasukkan anti T<sub>3</sub> yang sudah diencerkan dengan dapar fosfat, dikocok lalu dibiarkan 1/2 - 1 jam. Kolom dielusi dengan kira-kira 20 ml dapar fosfat, kemudian dicuci dengan 5 ml NaCl 0,9 %. Selanjutnya, kolom dielusi dengan dapar glisin-HCL pH 2,8, eluat ditampung dalam beberapa vial yang berisi 1 ml dapar tris pH 8 masing-masing dua ml. Fraksi yang mengandung IgG ditentukan resapannya dengan uv pada panjang gelombang 280 nm. Fraksi antibodi dikumpulkan dan didialisa dengan dapar borat 0,005 M pH 9,6 selama 24 jam.

### Optimasi konsentrasi glutaraldehid

Tiga ratus ml glutaraldehid pH 9,5 dengan variasi konsentrasi : 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 4% dipipet ke dalam tabung polietilen, larutan dibiarkan satu malam pada temperatur kamar dan 37 °C. Sisa glutaraldehid dibuang dan tabung dicuci dengan dapar fosfat pH 7,4. Selanjutnya antibodi dengan konsentrasi sama dipipet ke dalam tabung yang sudah diaktivasi dengan glutaraldehid, dibiarkan semalam supaya bereaksi dengan glutaraldehid. Sisanya dibuang dan tabung dicuci dengan dapar fosfat pH 7,4. Ditentukan ikatan maksimum, ikatan tidak spesifik dan sensitivitas dengan *radioimmunoassay* dengan konsentrasi antigen T<sub>3</sub>, 0 dan 10 nmol/l.

### Optimasi konsentrasi antibodi

Tabung yang sudah diaktivasi dengan glutaraldehid (hasil yang terbaik dari percobaan di atas), dipipetkan antibodi dengan pengenceran divariasikan. Selanjutnya dilakukan percobaan seperti di atas.

### Pengaruh pH terhadap aktivasi tabung

Glutaraldehid diencerkan dengan dapar fosfat pH 4; 6; 7,5; 8,5; 9,5 sampai konsentrasi 0,1 %. Masing-masing dipipet 300  $\mu$ l ke dalam tabung polietilen, dibiarkan satu malam dan selanjutnya dilakukan sama seperti di atas.

### Pengaruh waktu inkubasi glutaraldehid

Glutaraldehid dilarutkan pada pH 8 sampai konsentrasi 0,1 %. Dipipet 300  $\mu$ l ke dalam tabung polietilen lalu diinkubasi dengan waktu bervariasi yaitu 1 sampai 30 jam. Kemudian dilakukan percobaan seperti di atas.

### Menutup gugus aktif dari glutaraldehid yang masih bebas

Ke dalam tabung tabung reaksi yang sudah diaktivasi dengan glutaraldehid dipipet 300  $\mu$ l larutan trietanolamin 0,3 %, dibiarkan 1 jam, lalu didekantasi dan dicuci.

### Pengaruh volume assay

Dengan jumlah pereaksi yang terbaik dari serangkaian percobaan di atas, dicoba mengulangi dan volume diganti menjadi 500  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l.

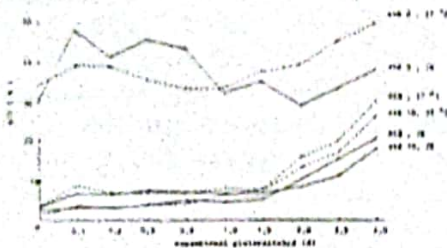
## HASIL DAN DISKUSI

Antisera mengandung bermacam-macam senyawa yang sangat kompleks selain antibodi. Bila antibodi ini digunakan untuk *radioimmunoassay* dengan metode pemisahan antibodi fase padat maka antibodi ini harus dimurnikan terlebih dulu. Pemurnian antibodi ini dapat dengan beberapa cara a.l : metode pengendapan menggunakan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, polietilen-glikol, MgSO<sub>4</sub>; kromatografi penukar ion menggunakan DEAE selulosa, sephadex A-25 atau 50, kromatografi affinitas, menggunakan protein A sepharose. Masing-masing metode akan menghasilkan tingkat kemurnian antibodi yang berbeda. Pemurnian dengan protein A akan menghasilkan antibodi yang relatif lebih murni karena protein A mengikat domain Fc dari antibodi. Untuk memudahkan penggunaannya maka protein A diikatkan pada fase padat sepharose CL-4B dengan bantuan cyanogen bromida (2).

Tujuan dari pemurnian antibodi ini adalah untuk menghilangkan matriks yang ada dalam antisera yang dapat menghalangi proses mobilisasi antibodi pada fase padat. Dengan antibodi yang murni masih banyak antibodi yang terikat pada tabung.

Sebelum antibodi diikatkan pada tabung, tabung diaktivasi dengan glutaraldehid. Glutaraldehid mempunyai gugus fungsi aldehid (karbonil) dan dapat terikat pada tabung setelah berpolimerisasi sesamanya. Gugus NH<sub>2</sub> yang terdapat pada molekul antibodi akan berikatan dengan gugus aldehid secara kovalen.

Hasil penentuan konsentrasi optimum glutaraldehid ditunjukkan oleh Gambar 1. Di sini terlihat puncak maksimum yaitu pada konsentrasi 0,1 dan turun sampai konsentrasi 1 %, kemudian naik lagi sebanding dengan kenaikan glutaraldehid. Apa yang menyebabkan terjadi hal ini, kemungkinan sbb : Pada puncak 1 kemungkinan ada gabungan proses kimia dan fisika. Dengan kenaikan konsentrasi glutaraldehid, proses fisika menurun dan pada puncak minimum, proses fisika hilang dan tinggal proses kimia saja. Proses kimia ini meningkat dengan meningkatnya konsentrasi glutaraldehid.

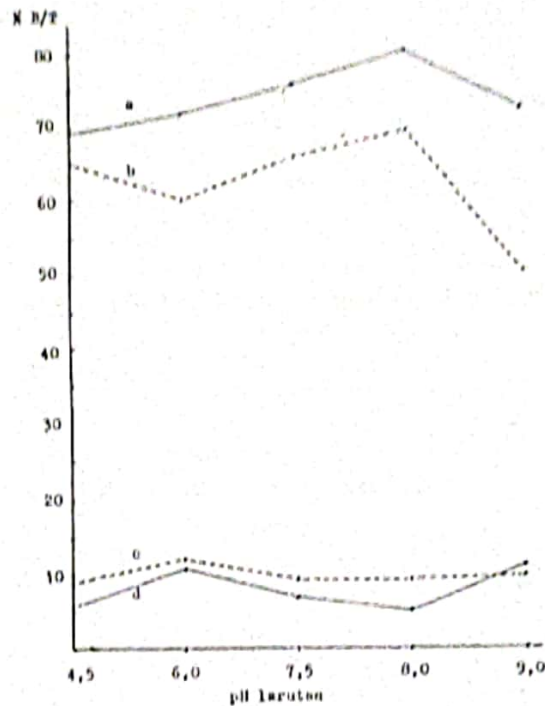


Gambar 1. Pengaruh konsentrasi glutaraldehid terhadap % ikatan.

Penempelan glutaraldehid juga ditentukan oleh keasaman larutan.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa penempelan glutaraldehid yang terbaik pada larutan yang sedikit basa (pH 8) sedangkan pada pH yang lebih rendah dan lebih tinggi ikatan maksimum menurun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hardy dan kawan-kawan (6) bahwa polimerisasi glutaraldehid berlangsung dengan cepat pada larutan yang sedikit basa (pH 8). Dari gambar ini terlihat juga bahwa

menggunakan konsentrasi glutaraldehid 0,1 % memberikan hasil assay yang lebih baik dari konsentrasi 2,5 %, baik ditinjau dari ikatan maksimum maupun dari kesensitifan (perbedaan persen ikatan pada konsentrasi 0 dan 10).



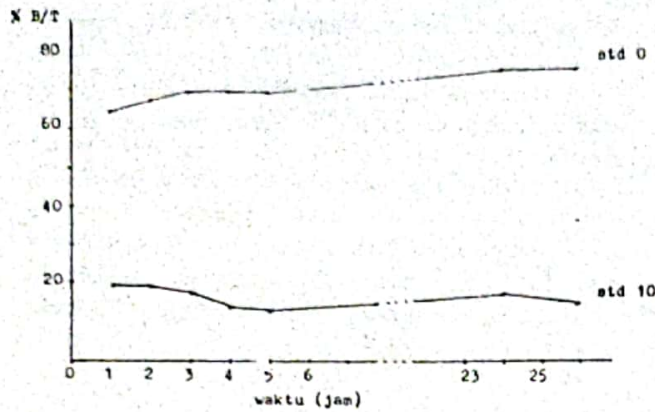
Gambar 2. Pengaruh pH terhadap penempelan glutaraldehid.

Keterangan:

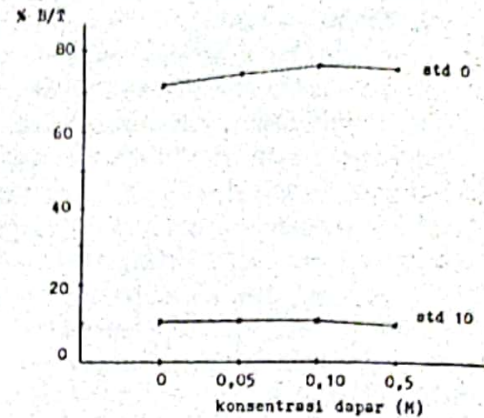
- a. glutaraldehid 0,1 %; standar 0 nmol/l.
- b. glutaraldehid 2,5 %; standar 0 nmol/l.
- c. glutaraldehid 2,5 %; standar 10 nmol/l.
- d. glutaraldehid 0,1 %; standar 10 nmol/l.

Lama penempelan glutaraldehid ditunjukkan pada Gambar 3. Di sini terlihat bahwa makin lama glutaraldehid dibiarkan pada temperatur kamar makin banyak polimerisasi sehingga ikatan makin besar. Kenaikan polimerisasi yang tinggi adalah pada 3 jam pertama dan sesudah itu akan mengalami pertambahan yang sedikit.

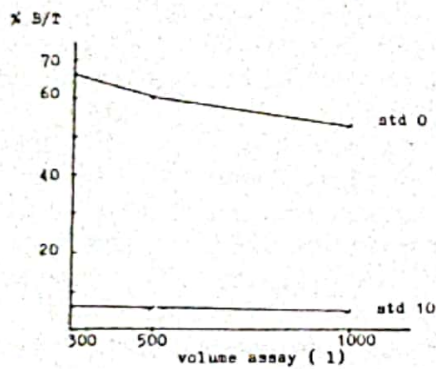
Volume reaksi ikut mempengaruhi jumlah ikatan. Semula diperkirakan bahwa volume reaksi akan berbanding lurus dengan persen ikatan dengan asumsi bahwa semakin besar volume reaksi semakin luas permukaan tabung yang dapat berikatan dengan antibodi. Gambar 4 menunjukkan data yang berlawanan. Pada volume reaksi yang semakin besar menghasilkan ikatan yang semakin rendah. Kemungkinan hal ini terjadi pengaruh pengenceran yang



Gambar 3. Pengaruh waktu penempelan glutaraldehid.



Gambar 5. Pengaruh kekuatan ion terhadap hasil assay.



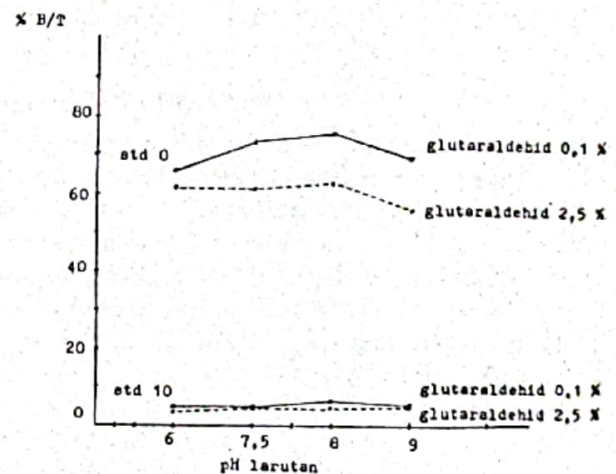
Gambar 4. Pengaruh volume assay terhadap persen ikatan.

lebih dominan. Dengan volume yang besar, konsentrasi semakin kecil dan hal ini akan memperlambat kecepatan reaksi. Kemungkinan kedua adalah bahwa antibodi cenderung untuk terikat pada dasar tabung.

Pengaruh kekuatan ion yang dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi dapar ditunjukkan pada Gambar 5. Di sini terlihat bahwa sebaiknya assay dilakukan dalam larutan dapar karena terlihat ada perbedaan ikatan maksimum dengan hanya menggunakan  $H_2O$  saja, dan terlihat pada Gambar 5 ini bahwa konsentrasi dapar fosfat yang memberikan ikatan maksimum tertinggi adalah pada konsentrasi 0,1 M. Gambar ini menunjukkan juga bahwa polimerisasi glutaraldehid tidak rusak pada pH dan konsentrasi demikian.

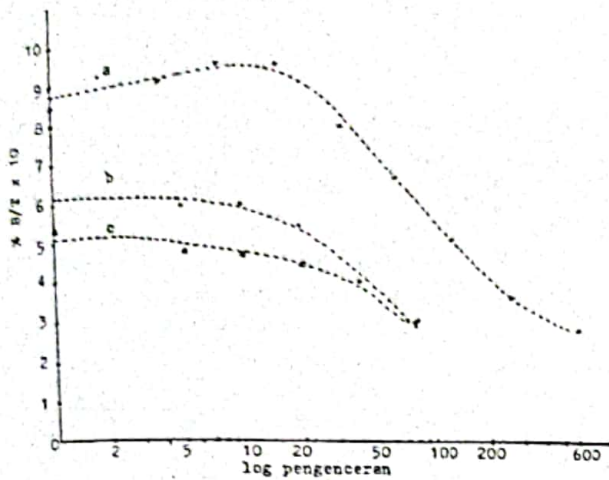
Dalam melakukan assay menggunakan tabung yang disalut antibodi ditentukan juga pengaruh keasaman. Pada Gambar 6 ditunjukkan

bahwa assay yang terbaik dilakukan pada pH 7,5 - 8, artinya reaksi imunologi anti  $T_3$  dan  $T_3$  berlangsung baik pada pH tersebut.



Gambar 6. Pengaruh pH assay pada reaksi imunologi.

Penentuan konsentrasi antibodi yang optimum adalah dengan titer antibodi setelah diikat pada fase padat. Gambar 7 adalah perbandingan titer antibodi menggunakan fase padat (kimia dan fisika) dan fase cair. Dari kurva ini diperoleh titer antibodi dengan reaksi fase cair dan fase padat secara kimia dan fisika masing-masing 130, 24 dan 4. Berdasarkan perbandingan hasil titer ini jelas bahwa assay pada fase padat membutuhkan antibodi yang lebih banyak dibandingkan dengan fase cair. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, reaksi pada fase padat lebih lambat dibanding fase cair, karena hanya sebagian molekul

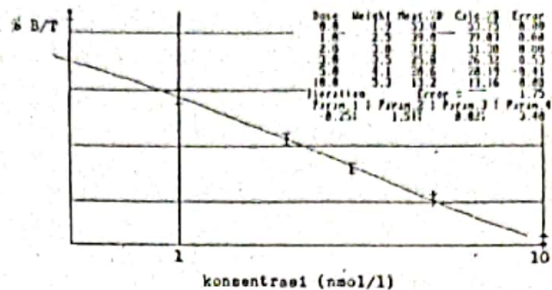


Gambar 7. Titer antibodi dengan metode antibodi rangkap (a), tabung bersalut antibodi secara kimia (b) dan tabung bersalut antibodi secara fisika (c).

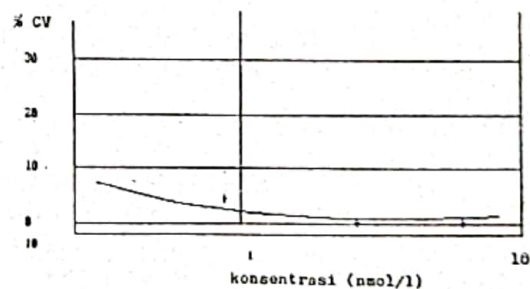
yang bergerak (antigen) sedang sebagian tidak bergerak. Kedua, antibodi yang digunakan tidak semuanya menempel pada tabung, ada sebagian yang tidak terikat dengan glutaraldehid sehingga ikut terbuang bersama larutan. Dibandingkan dengan cara fisika, cara kimia ini (dengan bantuan glutaraldehid) antibodi terikat lebih banyak pada tabung (pada percobaan ini 6 kali lebih banyak).

Setelah antibodi diikat pada tabung, dikhawatirkan ada gugus aktif dari glutaraldehid yang masih bebas, maka untuk mencegah terjadi reaksi dengan antigen pada saat *assay*, gugus aktif ini ditutup dengan trietanolamin. Ternyata dengan konsentrasi etanolamin 0,3 % sudah cukup untuk keperluan tersebut.

Kurva standar *assay*  $T_3$  menggunakan tabung bersalut antibodi dan kurva profil presisi (Gambar 8 dan 9) menunjukkan bahwa hasil *assay* cukup sensitif. Walaupun secara teoritis menggunakan metode pemisahan fase padat ini akan mengurangi sensitifitas karena konstanta asosiasi lebih rendah, tapi hal ini dapat diimbangi dengan konstanta disosiasi yang rendah pula sehingga sensitifitas tetap tinggi. Dari kurva ini terlihat bahwa daerah kerja sangat luas, mulai dari konsentrasi standar yang terendah (0 nmol/l) sampai yang tertinggi (10 nmol/l) diperoleh koefisien variansi dibawah 10 %.



Gambar 8. Kurva standar  $T_3$  menggunakan tabung bersalut antibodi.



Gambar 9. Kurva profil presisi  $T_3$  menggunakan tabung bersalut antibodi.

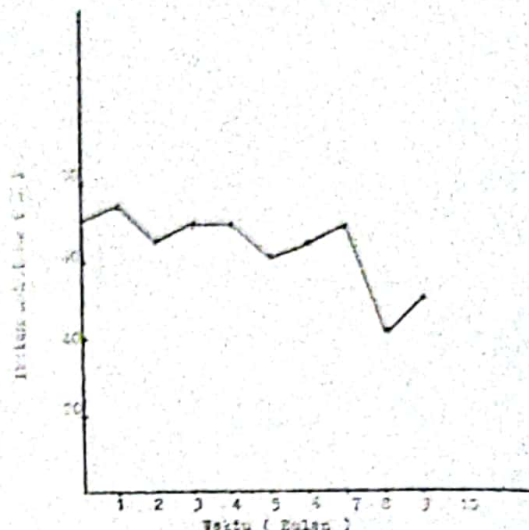
Ikatan tidak spesifik yang merupakan karakteristik yang penting pada *radioimmunoassay* cukup rendah, kira-kira  $1 \pm 0.4$  %.

Pada Tabel 1 dapat dilihat kriteria *assay* yang diperoleh dengan menggunakan antibodi fase padat dan dibandingkan dengan metode antibodi rangkap memberikan data-data yang mirip.

Pemantauan tentang kestabilan antibodi yang disalut pada tabung (Gambar 10) yang dievaluasi dari ikatan maksimum, sampai 7 bulan tidak menunjukkan perubahan pada hasil *assay*, berarti antibodi tersebut masih stabil.

Tabel 1. Kriteria assay yang diperoleh dengan tabung bersalut dan dengan metode

Kriteria	Tabung bersalut	Antibodi rangkap
Kemiringan	0,90 ± 0,26	1,04 ± 0,31
NSB	1,34 ± 0,16	0,80 ± 0,50
MB	60,8 ± 7,30	64,0 ± 5,40
A	0,86 ± 0,32	1,23 ± 0,22
B	2,55 ± 0,71	2,24 ± 0,23
C	5,98 ± 0,65	5,75 ± 0,33
ED 50	2,48 ± 0,37	1,50 ± 0,30



### KESIMPULAN

Glutaraldehyd dapat digunakan untuk mengaktivasi tabung dan konsentrasi yang dibutuhkan 0,1 %, waktu polimerisasi 3 jam pada pH 8. Konsentrasi antibodi ditunjukkan dengan titer adalah 130.

Hasil assay menunjukkan kurva standar yang baik dan kurva profil presisi yang baik, ikatan maksimum diatur sekitar 50 % dan ikatan tidak spesifik 5 %.

Assay T<sub>3</sub> dengan menggunakan tabung bersalut antibodi sangat praktis sehingga lebih

Gambar 10. Uji kestabilan antibodi yang disalut pada tabung dievaluasi dari ikatan maksimum.

disukai untuk penggunaan rutin serta dapat mengatasi masalah sentrifuga pada beberapa laboratorium, walaupun dibutuhkan antibodi yang lebih banyak dari pada menggunakan fase cair serta membutuhkan waktu untuk preparasi tabung bersalut antibodi tsb.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Chard, T., An Introduction to radioimmunoassay and related techniques, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982).
2. Dean, P.D.G., Johnson, W.S. and Middle, F.A., :Affinity Chromatography, IRL Press Limited, Oxford (1986).
3. Ichiro Chibata : Immobilized Enzymes, Kodansha Ltd, Tokyo (1978).
4. Ford, D.J, Radin, R. and Pesch, A.J., :Characterization of glutaraldehyde couple alkaline phosphatase-antibody and lactoperoxidase-antibody conyugates, Immonochemistry vol 15, Pergamon Press Ltd, Britain (1978) 237 - 243.
5. Avrameas, S., Ternynck, T.,: The cross-linking of protein with glutaraldehyde and its use for preparation of immunosorbents
6. Collowich, P., : Method of Enzymology, Academic Press NY, vol 44 (1976) 553.